

TGF β 抑制ピロール・イミダゾール・ポリアミドの前臨床試験 — 皮膚肥厚性癬痕に対する効果の検討

福田 昇¹⁾²⁾, 中井茂樹³⁾, 藤原恭子³⁾,
齋藤孝輔³⁾, 上野高浩¹⁾, 相馬正義³⁾

Pre-clinical study of pyrrole imidazole polyamide targeting TGF β — Analysis of its effects on hypertrophic scars

Noboru FUKUDA¹⁾²⁾, Shigeki NAKAI³⁾, Kyoko FUJIWARA³⁾,
Kosuke SAITO³⁾, Takahiro UENO¹⁾, Masayoshi SOMA³⁾

要旨

TGF- β 1は細胞外基質の増生, 線維芽細胞の遊走に関与し, 腎炎, 血管狭窄, 肝硬変症, 肺線維症などの線維性疾患の責任分子として知られているが, 未だにTGF- β 1を効果的に抑制する実地薬剤は実用化されていない。我々はこれまでにDNAに対し配列特異的に結合する性質を持つ低分子有機化合物ピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドを用いたTGF- β 1の発現抑制剤の開発を行ってきた。現在までにTGF- β 1抑制PIポリアミドが各種線維性疾患に対して治療効果を持つ事を, マウス, ラットの疾病モデルを用いて解析し報告してきた。今回我々は, ヒトとのゲノム相同性が高い霊長類コモン・マーモセットを用いてTGF- β 1抑制PIポリアミドの前臨床試験を行い, 同分子がマーモセット皮膚のTGF- β 1の発現を抑制し, 皮膚肥厚性癬痕の形成を顕著に抑制することを明らかにした。

1. はじめに

分子標的治療は疾病に関連した分子の発現や機能を制御する薬剤を用いた治療法であり, 低分子化合物, 抗体, 核酸薬などが治療薬として主に用いられている。近年, 癌や高血圧など難治性疾患の発症メカニズムが分子レベルで解明されるようになり, 多くの薬剤の開発が進んでいるが, 抗体や核酸薬は生体内での安定性の面で課題が多く, 現時点では製造コストが高いという難点もある。低分子化合物は生体への取り込みや安定性の面では優れており製造コストも低い, 化合物によっては標的外の分子に干渉するオフターゲット効果による副作用の問題が懸念される。

日本大学医学部戦略的研究基盤形成支援事業「ゲノム化学に基づく先進医療開発研究拠点」プロジェクトでは, 配列特異的なDNA結合能を持つピロール・イミダゾール・ポリアミド (PIポリアミド) を用いて, 疾患特異的に発現異常を起こしている遺伝

子の転写調節能を持つ分子を設計し, 治療薬としての可能性について検討している。

PIポリアミドは芳香族アミノ酸 N-methylpyrrole (Py) および N-methylimidazole (Im) で構成される低分子有機化合物であり, 配列特異的にDNAに結合する性質を持つ¹⁾。現在我々が主に開発対象としているPIポリアミドは, PyとImが鎖状につながり, 鎖の中央部に配置した γ -diaminobutyric acid の部分で屈曲したヘアピン構造を取る。この屈曲により分子内で向き合うPIポリアミドのペアごとに, 認識するDNA塩基が決まっており, Py-PyのペアはATまたはTAを, Py・ImはCGをIm・PyのペアはGC塩基対を認識する。ImとPyの組み合わせ次第で多様な配列のDNAに結合させることが可能であり, 遺伝子プロモーター領域の転写因子結合部位に対して設計した場合は, 転写因子の結合を競合的に阻害し, 下流の遺伝子発現を抑制することが可能となる。特別なDrug Delivery Systemがなくても細胞

1) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野
2) 日本大学大学院総合科学研究科
3) 日本大学医学部内科学系総合内科・総合診療医学分野,
相馬正義: souma.masayoshi@nihon-u.ac.jp

の核内に取り込まれ、核酸分解酵素やタンパク分解酵素による分解を受けず、生体内にて安定に存在できることから、PI ポリアミドは新規の転写阻害剤として期待される分子である。

これまでに我々の研究では、疾病特異的に発現異常を示している遺伝子のプロモーター領域に対してPI ポリアミドを設計し、標的遺伝子の発現抑制による治療効果を検証してきた。今までに、MMP-9 抑制PI ポリアミドが、ヌードマウス脾臓に移植したヒト大腸癌細胞株の肝臓への転移を抑制すること²⁾、E-box 認識PI ポリアミドが、骨肉腫細胞に対し *in vitro*, *in vivo* の両方で抗腫瘍効果を示すこと³⁾、酸化低密度リポ蛋白 (LDL) 受容体 (LOX-1) に対するPI ポリアミドがヒト血管内皮細胞の酸化LDLの取り込みを抑え、その結果細胞死を抑制する効果を示すこと⁴⁾ などについて報告を行っている。本紀要では、transforming growth factor- β (TGF β) の発現を抑制し、TGF β 関連疾患の治療薬として期待できるPI ポリアミドの開発状況について報告する。

2. TGF β 抑制PI ポリアミドの開発

1) 背景

TGF- β は線維芽細胞が足場非依存性増殖を獲得する際に必要な因子として発見されたサイトカインであるが、細胞増殖、分化、運動性の制御を行うなど多彩な機能を持つ。また細胞外基質の増生、線維芽細胞の遊走に関与し創傷治癒の際に機能していることも知られている。一方、疾病においては、腎炎、血管狭窄、肝硬変症、肺線維症、皮膚肥厚性癬痕などの線維性疾患の責任分子の1つであることが判っている。これらの疾患においては、TGF- β 1の発現・機能の抑制を行うことが治療効果につながる事が期待されるが、未だにTGF- β 1を効果的に抑制する実地薬剤は実用化されていない。これまでに動物モデルを用いて進行性腎障害⁵⁾や肝硬変、肺線維症、皮膚癬痕⁶⁾、腹膜硬化症⁷⁾などの線維性疾患に対するTGF- β 1抑制PI ポリアミドの遺伝子治療効果を確認してきた。例えば、ラットの背部皮膚に皮筋層に至る深さの切創を作り肥厚性癬痕を形成させる場合、皮膚切開直後に切創周辺に皮下注射によりTGF β 1抑制PI ポリアミドを投与すると、TGF β 1や間葉系細胞のマーカーであるVimentinの発現が非投与群と比べて明らかに抑制されていた。また癬痕

の形成も明らかに抑制されていたことから、TGF β 1抑制PI ポリアミドはTGF β 1の発現を抑制し、線維性疾患の治療に役立つ可能性が強く示唆された。しかしながら、これらの解析はラット、マウスを用いたものであるため、ヒトを対象とした薬剤を開発する上では、よりヒトに近いゲノム構造を持ったモデル動物を用いた全臨床試験が必要となる。そこで、我々は霊長類であるコモン・マーモセット (*Callithrix jacchus*) に着目した。

コモン・マーモセットは新世界猿に属する霊長類であり、体重300g、体長20cm 前後と小さく、ゲノム構造もヒトとの類似性が高いことから、実験動物として非常に適している。また、繁殖力も旺盛であり、旧世界猿であるアカゲザルやカニクイザルが性成熟に3年ほど要し、一生の産仔数が10頭前後であるのに対し、マーモセットは妊娠期間144日、性成熟に達するまでの期間が12~18ヶ月と短く、一生の間に40~80頭の子供を産出する。この点も実験動物として非常に理想的である。このような利点があることから、公益財団法人・実験動物中央研究所(実中研)では近年、コモン・マーモセットを飼養し、動物実験を行う体制を確立している⁸⁾。近年我々も薬剤開発を行う上で、マーモセットを用いた全臨床試験の必要性を痛感していたものの、日本大学医学部においてはマーモセットをはじめとした霊長類の飼養・実験設備がなく、実験は不可能であった。そこで、実中研の実験施設において、実中研が飼養しているコモン・マーモセットの皮膚肥厚性癬痕に対するTGF β 1抑制PI ポリアミドの効果の検討を行った⁹⁾。本紀要ではその成果について報告する。

2) ヒトTGF- β 1に対するPI ポリアミドの設計と機能解析

まず最初に、ヒトTGF- β 1プロモーター(転写開始点を起点として、558塩基上流から516塩基下流の部分)に対し、複数のPI ポリアミドGB1101~GB1107を設計した(図1)。GB1101は転写因子FSE2結合サイト、GB1105とGB1106は転写因子AP1結合サイトに近く、GB1107は転写因子NF-1の結合サイトに近い。これらのPI ポリアミドを10nMから10 μ Mの範囲で培養ヒト血管平滑筋細胞に投与し、TGF- β 1の発現量をreal time PCRにより定量したところ、GB1101、GB1105、GB1106の3つが非投

```

-592 ACAGGAGGCTGCTTAGCCACATGGGAGGTGCTCAGTAAAGGAGAGCAATTCTTACAGGTGCTGCTGCTCCT
      FSE2      GB1101
-522 GACCCTTCCATCCCTCAGGTGCTCTGTGCCCCCTCTCCCACTGACACCCCTCCGGAGGCCCCCATGTTG
-452 ACAGACCTCCTTCTCCTACCTTGTGTTCCAGCCTGACTCTCCTCCGTTCTGGGTCCCCCTCCTCTGGT
      AP-1      GB1105
-382 CGGCTCCCTCTGTCTCATCCCCCGGATTAAGCCTTCTCCGCCTGGTCTCTTCTCTGGTGACCCACAC
      GB1106  AP-1
-312 CGCCCGCAAAGCCACAGCGCATCTGGATCACCCGCTTGGTGGCCTTGGCCGCCAGGAGGCAGCACCCCT
      NF-1      GB1107
-242 GTTTGGGGGCCGAGCCGGGAGCCGCCCCTTCCCCAGGGCTGAAGGGACCCCCCTCGGAGCCCGC
      SP-1      SP-1
-172 CCACGCGAGATGAGGACGGTGGCCAGCCCCCATGCCCTCCCCCTGGGGCCGCCCGCTCCGCC
      SP-1      SP-1
-102 CTGTCGCTTCTGGGTGGGGCCGGGGCGGCTTCAAAACCCCCTGCCGACCCAGCCGGTCCCCGCCGCCG
      GB1102      ↓ GB1103
-32  CCGCCCTTCGCGCCCTGGGCCATCTCCCTCCACCTCCCTCCGCGGAGCAGCCAGACAGCGAGGGCCCCG
+39  GCCGGGGCAGGGGGGACGCCCCGTCGGGGCACCCCCCGGCTCTGAGCCGCCCGGGGGCCGGCCTCG
+109 GCCCGGAGCGGAGGAAGGAGTCGCCGAGGAGCAGCTGAGGCCCCAGAGTCTGAGACGAGCCGCCGCCG
+179 CCCC GCCACTGCGGGGAGGAGGGGGAGGAGCGGGAGGAGGACGAGCTGGTGGGAGAAGAGGAAAA
+249 AAACTTTTGAGACTTTCCGTTGCCGCTGGGAGCCGGAGGCGGGGACCTTTGGCGGACGCTGCCCC
      GB1104      +271      (+840-Met)
    
```

図1 ヒトTGF-β1のプロモーター配列と、PIポリアミドの認識部位
TGF-β1抑制PIポリアミドGB1101～GB1107の認識部位を下線で、転写因子の結合サイトを黒枠で示す。

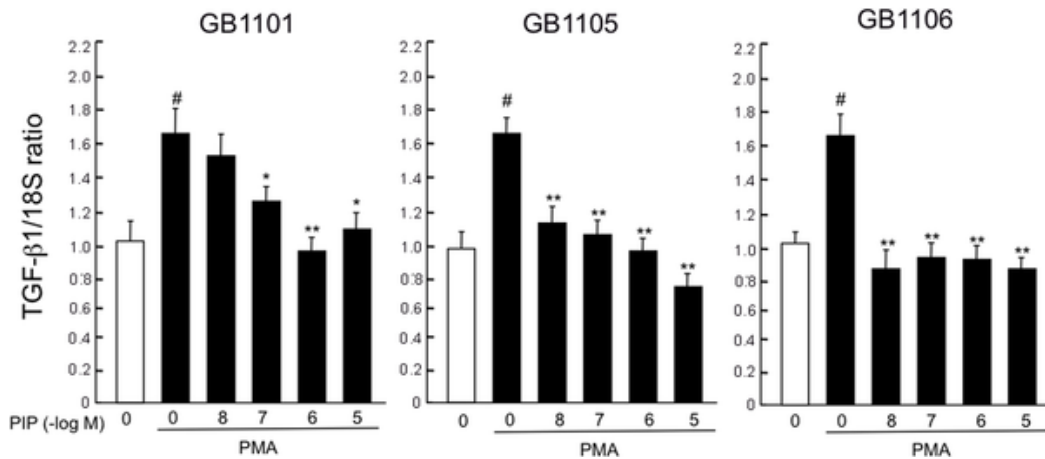


図2 TGF-β1PIポリアミドによるTGF-β1の発現抑制効果
血管平滑筋細胞にPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を添加するとTGF-β1の発現が上昇するが、ポリアミドGB1101, GB1105, GB1106の投与により、有意に発現が抑制された。

与群と比較して有意なTGF-β1発現抑制効果を示した(図2)。

BLAST解析の結果、このTGF-β1プロモーター領域のヒトとマウスの相同性は39.5%程度であるのに対し、ヒトとマーモセットの間では86%と高い相同性が見られることが確認された。詳細に配列を比

較したところ、上記の3つのPIポリアミドのうち、GB1101とGB1106の結合領域のDNA配列がヒトとマーモセットで共通であった。そこで、マーモセット皮膚より樹立した繊維芽細胞株に対するこれらのPIポリアミドの効果を調べたところ、GB1101が有意なTGF-β1発現抑制効果をしめしたことから、以降

の *in vivo* における解析はGB1101 について行った。

3) マーモセット皮膚癢痕に対するTGF-β1抑制PIポリアミドの作用の確認

成体の雄マーモセットの腹部皮膚の片側に、200 μg/ml の濃度のGB1101, もう片側に同じ濃度の mismatch 配列PIポリアミドもしくは水を500 μl 皮下注射し, その後, 各領域に長さ2cm, 皮筋層に達する切創を1本ずつ作成した。その後観察を行ったところ, 水投与部位と mismatch PIポリアミド投与部位では明確な皮膚の肥厚が見られたが, GB1101 投与部位においては肥厚化はほぼ完全に抑制されていた。図3 Aに切創作成後21日目と35日目の各切創の画像を示す。35日目に皮膚を生検し組織像を観察したところ, GB1101投与部位では他の2部位と比較して表皮層の肥厚化が有意に抑制されていた

(図3 B, C)。

組織の免疫染色の結果, GB1101投与部位においては, 水投与部位と比較してTGF-β1の発現低下が見られ, 更に間葉系マーカーであるVimentin 陽性部位の面積も低下していた(図3 D, E)。

以上の結果から, GB1101はマーモセットの皮膚切創において, TGF-β1の発現上昇とそれに伴う線維化を阻害し, 肥厚性癢痕の形成を抑制できることが証明された。

4) 軟膏を用いたGB1101の投与法の検討

GB1101を実際に人の肥厚性癢痕の治療に用いる場合は, 軟膏に溶解した状態で投与する必要があることから, 最も適した軟膏基剤を選定する実験を行った。5種類の軟膏基剤 (Vaseline, Plastibase, Hydrophilic ointment, Solbase, HPMC) に対し蛍光物

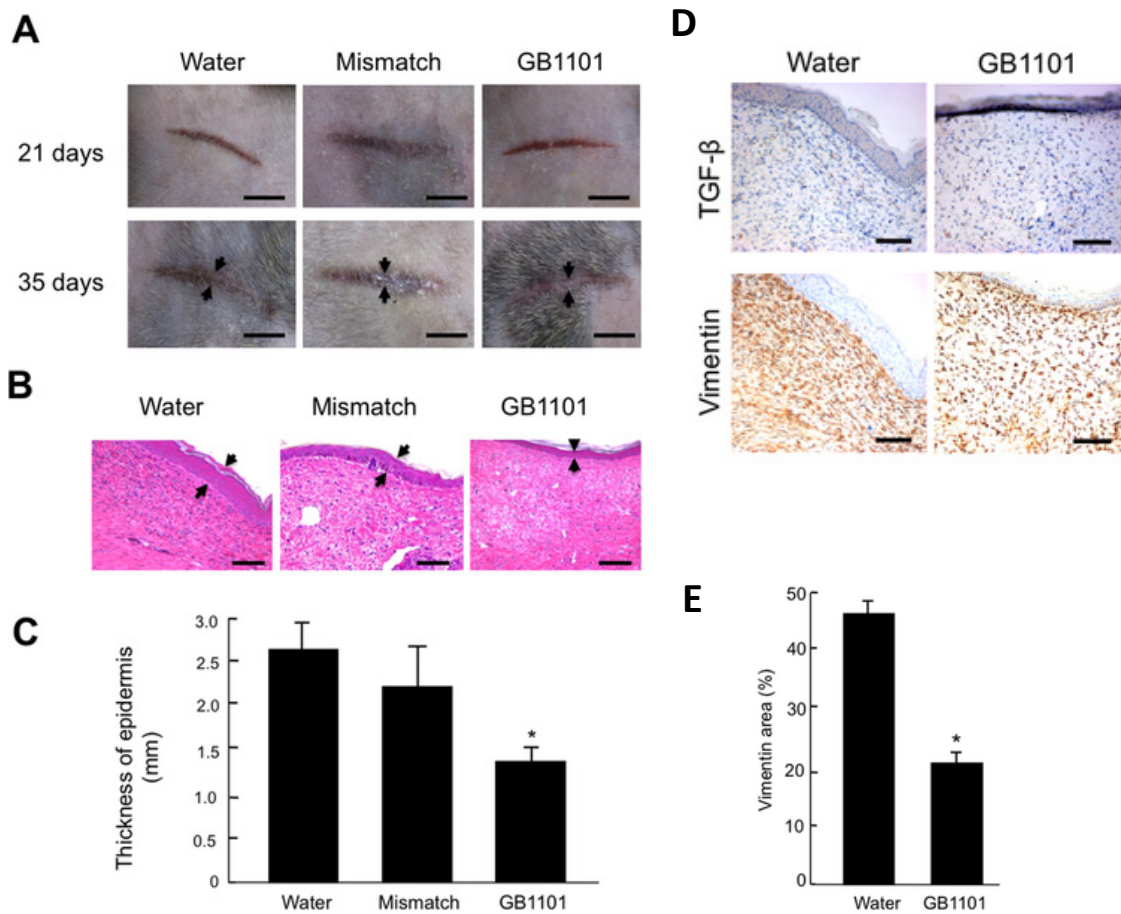


図3 TGF-β1PIポリアミドGB1101のマーモセット皮膚癢痕に対する効果

A: PIポリアミド投与および切創作成後21日目と35日目の患部の像, B: 患部の断面 (HE染色, 35日目), C: 表皮の厚さの計測値, D: 免疫染色によるTGF-β1とVimentinの検出, E: 免疫染色により検出されたVimentin陽性領域の面積

質FITCをラベルしたGB1101を溶解した。ラットの皮膚切創にGB1101入り軟膏を塗布し(GB1101の投与量は10 μ g)、24時間後と48時間後に皮膚切片を蛍光顕微鏡下で観察し、FITC-GB1101の細胞内への取り込みを確認したところ、Solbaseを用いた群において、GB1101の核への取り込みが顕著であった。この結果に基づき、マーモセット皮膚切創に対して、Solbaseに溶解したGB1101を30 μ g投与したところ、肥厚性癬痕の形成が抑制され、また真皮層のVimentin陽性部位の現象が観察された。以上の結果からSolbaseに溶解したGB1101は肥厚性癬痕の治療薬として有望であることが示された⁹⁾。

3. 考 察

以上の結果より、TGF- β 1抑制PIポリアミドであるGB1101が皮膚肥厚性癬痕の形成する作用を持つ事が、マーモセットを用いた前臨床試験で確認できた。GB1101はマーモセットとヒト両方のTGF- β 1プロモーター領域を認識することから、そのままヒトのTGF- β 1発現抑制剤として使用することが可能であり、今回の成果はPIポリアミドの実用化に大きく一歩近づいた成果であると言える。現在ところ、肥厚性癬痕の治療薬としてはTGF- β 1の機能を阻害する機能のあるトラニラストと副腎皮質ホルモンの二つが臨床の現場で使われているが、トラニラストの作用はTGF- β 1特異的なものでなく効果も弱いことから、これらの治療薬は肥厚性癬痕を完治させるには至らない。そのためGB1101は新規の肥厚性癬痕治療薬候補として非常に期待できると考えている。

4. 今後の展望

今回の報告では、観察が容易な皮膚病変について検討したが、TGF- β 1が原因となっている他の線維性疾患に対してもGB1101を適用するために、ラット・マウスを用いた解析同様、マーモセットモデルを用いた検討が必要となる。モデル動物として歴史が浅く、確立された疾病モデルの種類が少ないこと、飼育費用が高い点など、実現には困難を伴うが、現在、免疫抑制剤シクロスポリンAを用いたマーモセットの腎症モデルの確立を急いでいる。現在までにマーモセットの腎症モデルを作成した例はなく、GB1101のヒト腎症に対する治療効果を調べる上で、

非常に効果的である。

また、以上の研究と並行して、我々はTGF- β 1抑制PIポリアミドを用いたiPS細胞の高効率な誘導法の開発も行っている。分化した多細胞に初期化因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc等)を導入すると、細胞が初期化され多能性を持ったiPS細胞となるが、この際E-Cadherinの増加とTGF- β 1の抑制による、間葉細胞の上皮化(mesenchymal-epithelial transition:MET)が多能性獲得のためのカギとなるステップとなることが判ってきた。そこでGB1101を併用して、簡便で高効率なiPS細胞誘導を行うためのプロトコルの確立を行った(Saito, in preparation)。

これらの研究を通じて、TGF- β 1抑制PIポリアミドの医療応用および研究ツールとしての活用を実現していきたいと考えている。

参考文献

- 1) Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem.* 2001; **9**(9):2215-35.
- 2) Wang X, Nagase H, Watanabe T, et al. Inhibition of MMP-9 transcription and suppression of tumor metastasis by pyrrole-imidazole polyamide. *Cancer Sci.* 2010; **101**(3):759-66.
- 3) Taniguchi M, Fujiwara K, Nakai Y, Ozaki T, Koshikawa N, Toshio K, Kataba M, Oguni A, Matsuda H, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Fukuda N, Ueno T, Soma M, Nagase H. Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer, a pyrrole-imidazole polyamide, which targets an E-box motif Original Research Article. *FEBS Open Bio* 2014; **4**: 328-334
- 4) Ueno T, Fukuda N, Tsunemi A, et al. A novel gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide targeting human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 gene improves endothelial cell function. *J Hypertens.* 2009; **27**(3):508-16.
- 5) Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Transcriptional inhibition of progressive renal disease by gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting of the transforming growth factor- β 1 promoter. *Kidney Int.* 2011; **79**(1):46-56.
- 6) Washio H, Fukuda N, Matsuda H, et al. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide, targeting the TGF- β 1 promoter. *J Invest Dermatol.* 2011; **131**(10):1987-95.
- 7) Serie K, Fukuda N, Nakai S, Matsuda H, Maruyama T, Murayama Y, Omata S. Pyrrole-imidazole polyamide targeting transforming growth factor β 1 ameliorates encapsulating peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int.* 2012; **32**(4):462-72.

- 8) Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Tomioka I, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito M, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H, Nomura T. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*. 2009; **459**(7246):523-528
- 9) Igarashi J, Fukuda N, Inoue T, Nakai S, Fujiwara K, Matsuda H, Ueno T, Matsumoto Y, Watanabe T, Nagase H, Bando T, Sugiyama H, Itoh T, Soma M. Preclinical Study of Novel Gene Silencer Pyrrole - Imidazole Polyamide Targeting Human TGF - β 1 Promoter for Hypertrophic Scars in a Common Marmoset Primate Model. *PLoS One*. 2015; **10**(5):e0125295.